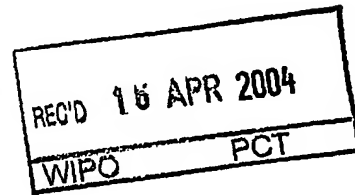


# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

## PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



### Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:**

103 11 620.6

**Anmeldetag:**

17. März 2003

**Anmelder/Inhaber:**

BioTissue Technologies GmbH, 79108 Freiburg/DE

Erstanmelder:

BioTissue Technologies AG, 79108 Freiburg/DE

**Bezeichnung:**

Knorpelzell-Kulturmedium und Verwendung desselben

**IPC:**

C 12 N 5/08

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 23. März 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Ebert

BEST AVAILABLE COPY

Anmelder: BioTissue Technologies AG  
Anwaltsakte: 47 739 V.

## **Knorpelzell-Kulturmedium und Verwendung desselben**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein für Knorpelzellen geeignetes und vorzugweise für Knorpelzellen selektives Kulturmedium.

### **Hintergrund der Erfindung**

Die Knorpelzellen (Chondrozyten) sind Zellen, die für die Bildung von Knorpelgewebe vor allem in Gelenken verantwortlich sind. Verletzungen des Knorpels beispielsweise aufgrund von Unfällen oder altersbedingte und/oder verschleißbedingte Schäden des Knorpel führen meist zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Beweglichkeit und zu Schmerzen beim Betroffenen.

Defekte von Knorpelgewebe ließen dem Mediziner früher nur die Wahl, das betroffene Gelenk ruhig zu stellen. Im Rahmen der modernen Transplantationsmedizin können derartige Defekte heute häufig durch Transplantation entsprechenden Gewebematerials gelindert oder behoben werden.

Üblicherweise werden die Zellen bei einem derartigen Verfahren in eine dreidimensionale Trägerstruktur eingelagert, wobei die Form der Trägerstruktur meist der Form des späteren Implantates entspricht. Die US-Patente der Nr. 5 053 050 und 5 736 372 beschreiben Zusammensetzungen zur Reparatur von Knorpel oder Knochen, wobei Knorpel- oder Knochenzellen in eine biologisch resorbierbare Trägersubstanz eingebracht werden. Zur Stützung der Zellkultur können der Nährlösung das Zellwachstum fördernde Substanzen, Adhäsionsfaktoren usw. zugesetzt werden.

Gelenkknorpelersatz bzw. Knorpeltransplantate, bestehend aus Trägermaterial (bspw. einem resorbierbaren Vlies), biologischer Matrix (bspw. einem Gel) und autologen Zellen, insbesondere Chondrozyten, wird bzw. werden üblicherweise durch Anzucht der Chondrozyten aus dem Biopsat in 3-D-Kultur für ca. 7 Wochen in einem RPMI-Medium, Einbettung der Chondrozyten in die Matrix bspw. durch Einwälken sowie eine anschließende 2 - 5-tägige Vorkultivierung im Vlies erzeugt. Jedes für die Züchtung der Knorpelzellen verwendete Kulturmedium muss folgendes leisten:

Erstens muss es auf die Knorpelzellen proliferationsfördernd wirken. Zweitens sollte es die Dedifferenzierung der Chondrozyten hin zu einem Fibroblastoiden Typus möglichst hinauszögern. Da Dedifferenzierung und starke Poliferation meist eng zusammenhängen, muss ein geeigneter Kompromiß zwischen wachstumsfördernden und die Differenzierung stabilisierenden Eigenschaften gefunden werden. Schließlich muss ein Kulturmedium den chondrogenen Charakter der Knorpelzellen erhalten.

Kommerziell für medizinische Zwecke wird derzeit üblicherweise als Kulturmedium RPMI 1640 (enthaltend: Glucose, Aminosäuren, Vitamine, Salze und Carbonat-Puffer) ggf. supplementiert mit Humanserum meist 10 - 15 % verwendet. Letzteres muss vom Spender gewonnen werden, wobei die Gewinnung für diesen eine weitere Belastung darstellt. Die zu transplantierenden Zellen werden in diesem Medium üblicherweise ca. 7 Wochen bis zur gewünschten Zellzahl kultiviert. Nach dem Beimpfen auf den Transplantatträger müssen die Zellen bis zur Transplantation noch 2-5 Tage im Differenzierungsmedium kultiviert werden.

Für wissenschaftliche Zwecke verwendet man als Kulturmedium in der Regel ein mit FCS (meist 15 %) supplementiertes RPMI-Medium. Dies ist für die medizinische Verwendung ausgeschlossen.

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Knorpelzell-Kulturmedium bereitzustellen, welches die oben genannten Kriterien erfüllt. Es ist weiterhin Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Knorpelzell-Kulturmedium bereitzustellen, welches eine Verkürzung der Kulturzeiten bis zur Erzielung der gewünschten Zellzahl und/oder eine

Verringerung Zeitspanne bis zur Beimpfen des Transplantatträgers gestattet. Eine Minimierung des Gehalts an Humanserum vereinfacht die Logistik und stellt eine wesentliche Erleichterung für den Patienten dar.

### **Zusammenfassung der Erfindung**

Die genannten Aufgaben werden erfindungsgemäß gelöst durch ein Knorpelzell-(Chondrozyten)-Kulturmedium, enthaltend ein für die Kultur von primären human Zellen geeignetes Basismedium, dem zusätzlich folgende Wachstumsfaktoren zugesetzt werden: 0,5 – 50,0 ng/ml EGF, 0,5 – 50,0 ng/ml FGF, 0,1 – 10,0 ng/ml PDGF, 0,5 – 50,0 ng/ml IGF, 1,0 – 100,0 ng/ml Dexamethason und 0,1 – 10,0 mM Glutamin. Dieses kann, falls gewünscht, mit 0 - 15 % Humanserum supplementiert werden.

In einem zweiten Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung eines wie oben definierten Knorpelzell-Kulturmediums zur Züchtung von Knorpelzellen.

### **Kurze Beschreibung der Zeichnung**

Fig.1 zeigt in Form eines Balkendiagrammes die Zellzahl nach 8tägiger Kultur in verschiedenen Kulturmedien, erhalten gemäß Beispiel 1.

Fig.2 zeigt die Zeit bis zum Erhalt einer gewünschten Zellzahl am Vergleich dreier Biospate in herkömmlichem Medium (RPMI) und einem erfindungsgemäßen Medium.

### **Genaue Beschreibung der Erfindung**

Wie oben beschrieben, betrifft die Erfindung ein spezielles, wie in den Ansprüchen definiertes Knorpelzell-Kulturmedium. Dieses Knorpelzell-Kulturmedium enthält vorzugsweise ausschließlich nach dem AMG sowie nach den GMP-Richtlinien der EU zur

Verwendung am Menschen zugelassene Substanzen. Die aus der Kultur gewonnenen Knorpelzellen (Chondrozyten) können damit ohne Bedenken hinsichtlich des Kulturmediums als Transplantat verwendet werden.

Das erfindungsgemäße Knorpelzell-Kulturmedium enthält ein für die Kultur von primären human Zellen geeignetes, vorzugsweise reichhaltiges Basismedium, das zusätzlich enthält: 0,5 – 50,0 ng/ml EGF, 0,5 – 50,0 ng/ml FGF, 0,1 – 10,0 ng/ml PDGF, 0,5 – 50,0 ng/ml IGF, 1,0 – 100,0 ng/ml Dexamethason und 0,1 – 10,0 mM Glutamin. Vorzugsweise enthält das Knorpelzell-Kulturmedium zusätzlich 5,0 – 20,0 ng/ml EGF, 5,0 – 20,0 ng/ml FGF, 1,0 – 6,0 ng/ml PDGF, 5,0 – 20,0 ng/ml IGF, 10,0 – 60,0 ng/ml Dexamethason und 1,0 – 6,0 mM Glutamin noch stärker bevorzugt 10,0 ng/ml EGF, 10,0 ng/ml FGF, 3,0 ng/ml PDGF, 10,0 ng/ml IGF, 40,0 ng/ml Dexamethason und 4,0 mM Glutamin.

Erfindungsgemäß kann grundsätzlich jedes bekannte und für die Kultivierung von primären human Zellen geeignete Basismedium verwendet werden. Bevorzugt handelt es sich um ein relativ reichhaltiges Medium (kein Mangelmedium). Das Basismedium kann jede geeignete Kohlenstoff- und/ oder Stickstoffquelle verwendet werden. Vorzugsweise werden Kohlenstoff- und Stickstoffquellen verwendet, die den Vorgaben des AMG und der GMP-Richtlinie entsprechen. Die Konzentrationen sind hier variabel und können vom Fachmann anhand von Routineversuchen bestimmt und optimiert werden. Das Medium weist weiterhin vorzugsweise einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt von nicht über 2,5 mM, vorzugsweise nicht über 1,8 mM auf. Bevorzugt liegt der Gehalt an  $\text{Ca}^{2+}$  außerdem nicht unter 0,4 mM, stärker bevorzugt nicht unter 0,6 mM.

Geeignete und für die Zwecke der vorliegenden Erfindung bevorzugte Medien sind ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus Eagle's MEM, DMEM, MEM, RPMI und OptiPro. Ein besonders bevorzugtes Medium ist das Basalmedium OptiPro®, das von der Firma Invitrogen, vertrieben wird.

Der erste Zusatz des erfindungsgemäßen Knorpelzell-Kulturmediums ist ein EFG (Epidermal Growth Factor) in einer Menge von 0,5 bis 50,0 ng/ml, vorzugsweise 5,0 bis 20,0 ng/ml, am meisten bevorzugt 10,0 ng/ml. Der EGF ist ein genereller Wachstumsfaktor

für mesenchymate Zellen. Bevorzugt handelt es sich um rekombinantes, noch stärker bevorzugt rekombinantes human EGF (rh EGF).

Der zweite Zusatz des erfindungsgemäßen Knorpelzell-Kulturmediums der basic FGF (Fibroblast Growth Factor) in einer Menge von 0,5 bis 50,0 ng/ml, vorzugsweise 5,0 bis 20,0 ng/ml, am meisten bevorzugt 10,0 ng/ml. Der bFGF ist in vivo ein genereller Wachstumsfaktoren für mesodermale und neuro-ectodermale Zellen. In vitro schränkt der bFGF die Ansprüche an die Serumqualität ein. Bevorzugt handelt es sich um einen rekombinanten, noch stärker bevorzugt einen rekombinanten, humanen bFGF.

Der dritte Zusatz des erfindungsgemäßen Knorpelzell-Kulturmediums ist der PDGF (Platelet Derived Growth Factor) in einer Menge von 0,1 bis 10,0 ng/ml, vorzugsweise 1,0 bis 6,0 ng/ml, am meisten bevorzugt 3,0 ng/ml. Unter den Oberbegriff PDGF fällt ein ganzes Spektrum an verwandten Molekülen, denen verschiedene Aufgaben zukommen. U.a. fungieren die PDGF als Wachstumsfaktoren, bei der Wundheilung und als Chemotaxisfaktoren. Bevorzugt verwendet man einen rekombinanten human PDGF (rh PDGF). Stärker bevorzugt handelt es sich um BB-Homodimere.

Der vierte Zusatz des erfindungsgemäßen Knorpelzell-Kulturmediums ist IGF-1 (Insulin-like Growth Factor) in einer Menge von 0,5 bis 50,0 ng/ml, vorzugsweise 5,0 bis 20,0 ng/ml, am meisten bevorzugt 10,0 ng/ml. Der Ausdruck IGF bezeichnet als Oberbegriff insbesondere den IGF-1 und den IGF-2. Die IGF stellen starke Wachstumsfaktoren u.a. für Knorpelzellen dar. Sie wirken zum Teil synergistisch mit anderen Wachstumsfaktoren. Bevorzugt verwendet man einen rekombinanten, stärker bevorzugt rekombinanten human IGF (rh IGF).

Bei dem fünften Zusatz des erfindungsgemäßen Knorpelzell-Kulturmediums handelt es sich um Dexamethason in einer Menge von 1,0 bis 100,0 ng/ml, vorzugsweise 10,0 bis 60,0 ng/ml, am meisten bevorzugt 40,0 ng/ml. Dexamethason (9 $\alpha$ -Fluor-16 $\alpha$ -methylprednisolon) ist ein halbsynthetisches Glucocorticoid, welches die ACTH-Sekretion beeinflusst. Dexamethosan ist ein Differenzierungsfaktor für Knorpelzellen.

Bei dem sechsten Zusatz des erfindungsgemäßen Knorpelzell-Kulturmediums handelt es sich um Glutamin in einer Menge von 0,1 bis 10,0 mM, vorzugsweise 1,0 bis 6,0 mM, am meisten bevorzugt 4,0 mM. Glutamin ist eine der natürlich vorkommenden Aminosäuren, die üblicherweise als Stickstoffquelle dienen kann.

Weiterhin kann, das erfindungsgemäße Medium mit Humanserum, vorzugsweise autologisch in einer Menge von 0-15 %, vorzugsweise 0-10 %, am meisten bevorzugt 3-5 % (Gew/Vol) supplementiert sein, muss aber nicht. Das zeigt, dass das erfindungsgemäße Kulturmedium eine vorteilhafte Verringerung dieses Zusatzes ermöglicht, der nach dem Stand der Technik bislang in höheren Mengen erforderlich war.

In einem zweiten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung des oben beschriebenen Knorpelzell-Kulturmediums zur Züchtung von Knorpelzellen, insbesondere zu deren selektiver Züchtung. Die Kulturbedingungen sind dem Fachmann bekannt und können anhand von Routineexperimenten optimiert werden.

Die Züchtung der Knorpelzellen unter Verwendung des erfindungsgemäßen Mediums erfolgt ausgehend von Gewebebiopsien eines Spenders und vorzugsweise des zu behandelnden Patienten selbst. Vorzugsweise sind die erhaltenen Knorpelzellen zur Reimplantation in den Menschen, insbesondere den Spender bestimmt. Sind Spender und Empfänger identisch, ist eine Transplantatabstoßung nicht zu befürchten, sofern nicht das Kulturmedium antigene Substanzen enthält. Letzteres entspricht nicht dem AMG und ist daher nicht erwünscht.

Ein überraschender und nicht zu erwartender Vorteil des erfindungsgemäßen Mediums mit der erfindungsgemäßen Zusatzkombination sind die hohen Vermehrungsraten der Knorpelzellen, im Beispiel mit nur 3 % humanen autologen Serum. In entsprechenden Vergleichsversuchen mit dem kommerziell verwendeten Medium RPMI, supplementiert mit Humanserum (10% und 15%), hat die Anmelderin gefunden, dass das erfindungsgemäße Knorpelzell-Kulturmedium hinsichtlich der Wachstumsraten verbesserte Ergebnisse liefert. Konkret lässt sich die Zeit bis zum Beimpfen des Transplantatträgers und anschließend bis zur Transplantation mit Hilfe des

erfindungsgemäßen Kulturmediums deutlich senken. Durch kürzere Kultivierung und optimierte Faktoren sind die Zellen weniger dedifferenziert. Das chondrogenes Potential und damit die Produktqualität ist somit erhöht. Gemäß der bevorzugten Ausführungsform kann beispielsweise diese Zeit um das 3,5-fache verkürzt werden.

## Beispiele

### Beispiel 1

In einem ersten Beispiel wurden je 0,1 Mio. Zellen eines Biopsats, d.h. identischen Ursprungs, in fünf verschiedenen Medien kultiviert und die Zellzahl nach 8 Tagen in Kultur bestimmt. Die Kultur erfolgte bei 37 °C in Zellkulturflaschen. Verwendet wurde als Vergleich RPMI, supplementiert mit 15 % Humanserum (HS) bisherige Knorpelmedium sowie das Medium Optipro der Fa. Invitrogen und Wachstumszusätze, supplementiert mit 3 % HS:

**Tabelle 1: Verwendete Wachstumszusätze (BTT Faktormix)**

Zusatz	Menge
EGF:	10 ng/ml
FGF:	10 ng/ml
PDF:	3 ng/ml
IGF:	10 ng/ml
Dexamethason:	40 ng/ml
Glutamin:	4 mM

**Tabelle 2: Verwendete Medien**

Basismedium	Humanserum (%)	BTT Faktormix
RPMI	3	+
RPMI (Vergl.)	15	-
OptiPro®	3	+
OptiPro®	-	+
OptiPro® (Vergl.)	3	-

Zum direkten Vergleich wurden parallele Zellkulturen aus Biopsaten derselben Testpersonen mit den in Tabelle 2 genannten Medien etabliert und nach gängigen Verfahren geführt. Im Ergebnis entspricht das Wachstum und die Morphologie von etablierten Knorpelzell-Kulturen mit dem erfindungsgemäßen Medium etwa denjenigen des supplementären RPMI-Mediums.

Allerdings bietet das erfindungsgemäße Medium Vorteile bei der Etablierung der Kultur, dahingehend, dass die Zellausbeute bei geringerer Supplementierung mit HS durchschnittlich 2,5 bis 10-mal höher liegt. Die Ergebnisse sind in Fig. 1 gezeigt.

Gleichzeitig lässt sich dadurch die Kulturdauer und Zahl der erforderlichen Passagierungen bis zum Erhalt der zum Beimpfen des Transplantats erforderlichen Zellzahl senken. Insgesamt kann damit die Transplantation früher und mit besserer Zellqualität erfolgen.

#### Beispiel 2:

In einem zweiten Versuch wurden Biopsate dreier Spender jeweils in erfindungsgemäßen Medium (Nr.3 oben; OptiPro® mit 3% HS und Zusätzen) bzw. RPMI (10% HS) kultiviert und die Dauer bis zum Erhalt der erforderlichen Zellzahl in der Kultur, ausgehend von identischen Okulaten, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Fig. 2 gezeigt.

Aus Fig. 2 ist ersichtlich, dass sich durch Kultivieren im erfindungsgemäßen Medium die Zeit bis zum Erhalt einer Zellzahl von 60 Mio. Zellen in Abhängigkeit vom Alter des Spenders deutlich (ca. um das 3-fache) verkürzen lässt.

Anmelder: BioTissue Technologies AG

Anwaltsakte: 47 739 V

### Patentansprüche

1. Knorpelzell-Kulturmedium, enthaltend ein für die Kultur von primären human Zellen geeignetes Basismedium und zusätzlich: 0,5 – 50,0 ng/ml EGF, 0,5 – 50,0 ng/ml FGF, 0,1 – 10,0 ng/ml PDGF, 0,5 – 50,0 ng/ml IGF, 1,0 – 100,0 ng/ml Dexamethason und 0,1 – 10,0 mM Glutamin.
2. Knorpelzell-Kulturmedium nach Anspruch 1, enthaltend: 5,0 – 20,0 ng/ml EGF, 5,0 – 20,0 ng/ml FGF, 1,0 – 6,0 ng/ml PDGF, 5,0 – 20,0 ng/ml IGF, 10,0 – 60,0 ng/ml Dexamethason und 1,0 – 6,0 mM Glutamin.
3. Knorpelzell-Kulturmedium nach Anspruch 1, enthaltend: 10,0 ng/ml EGF, 10,0 ng/ml FGF, 3,0 ng/ml PDGF, 10,0 ng/ml IGF, 40,0 ng/ml Dexamethason und 4,0 mM Glutamin.
4. Knorpelzell-Kulturmedium nach einem der vorstehenden Ansprüche, zusätzlich enthaltend bis zu 15 % (w/v) Humanserum.
5. Knorpelzell-Kulturmedium nach Anspruch 4, zusätzlich enthaltend 3 bis 5 % (w/v) Humanserum.
6. Knorpelzell-Kulturmedium nach einem der vorstehenden Ansprüche, in dem das Basismedium ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Eagle's MEM, DMEM, PPMI, MEM und OptiPro®.
7. Verwendung eines Knorpelzell-Kulturmediums gemäß einem der vorstehenden Ansprüche zur Züchtung von Knorpelzellen.

8. Verwendung nach Anspruch 7, worin die Züchtung ausgehend von Gewebebiopsien eines Patienten erfolgt.
9. Verwendung nach Anspruch 7 oder 8, worin die Knorpelzellen zur Reimplantation in den Menschen bestimmt sind.
10. Knorpelzellsuspension in einem Medium gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6.

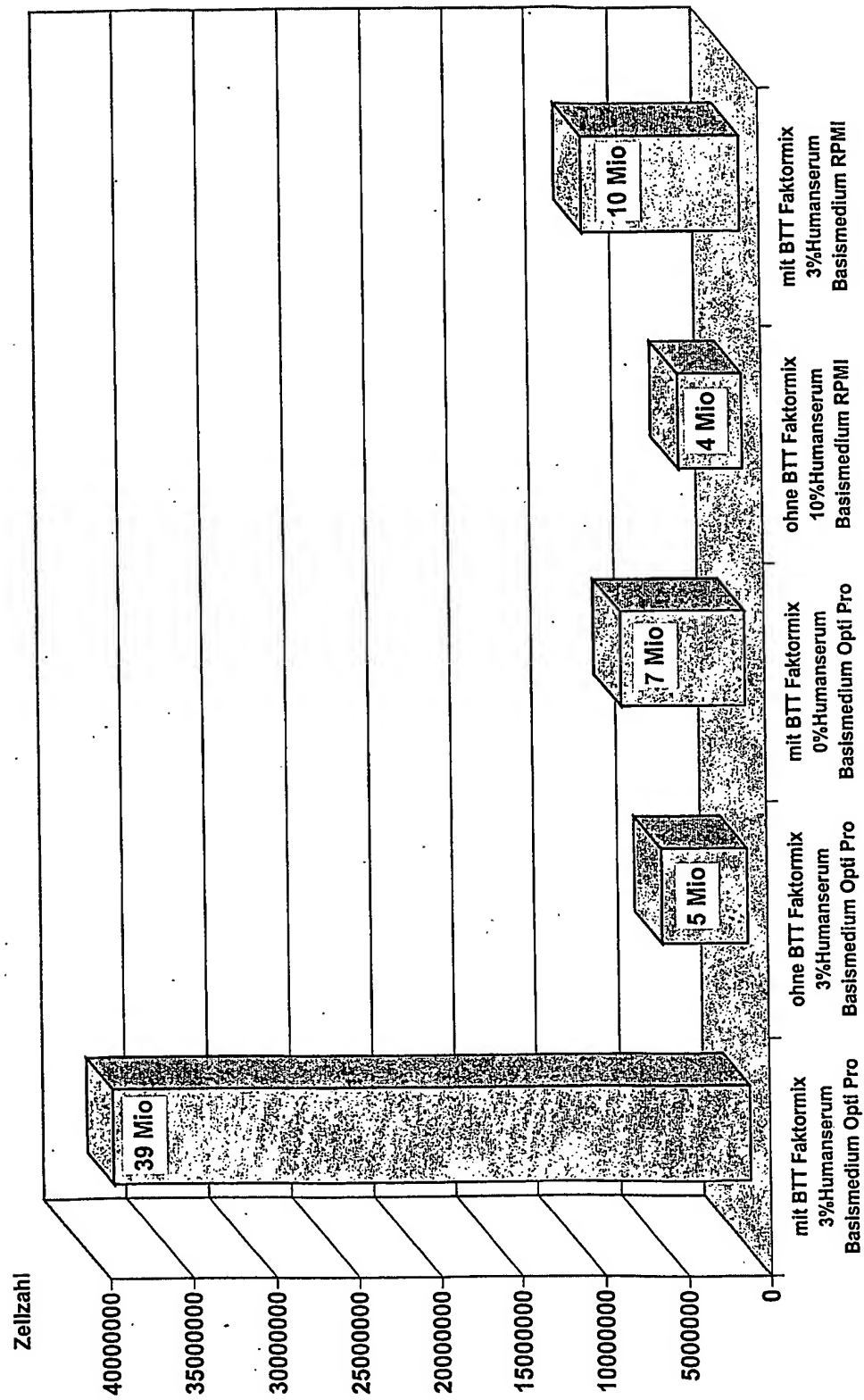
Anmelder: BioTissue Technologies AG  
Anwaltsakte: 47 739 V

### **Zusammenfassung**

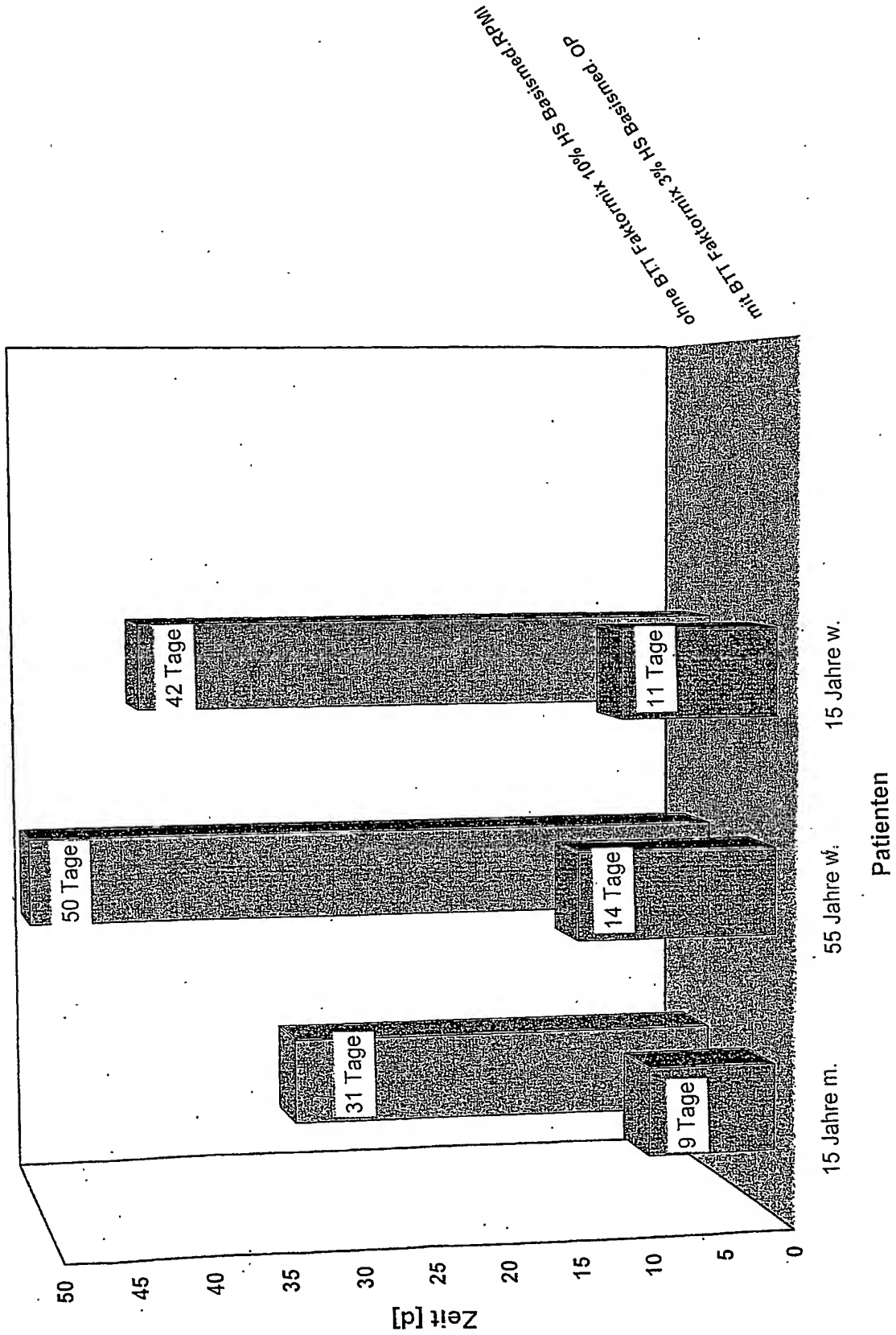
Knorpelzell-Kulturmedium, enthaltend ein für die Kultur von primären human Zellen geeignetes Basismedium, welches Kulturmedium zusätzlich enthält: 0,5 – 50,0 ng/ml EGF, 0,5 – 50,0 ng/ml FGF, 0,1 – 10,0 ng/ml PDGF, 0,5 – 50,0 ng/ml IGF, 1,0 – 100,0 ng/ml Dexamethason und 0,1 – 10,0 mM Glutamin, ggf. supplementiert mit 0-15 % autologem Humanserum.

In einem zweiten Aspekt betrifft die Erfindung die Verwendung eines wie oben definierten Knorpelzell-Kulturmediums zur Züchtung von Knorpelzellen (Chondrozyten).

Figur 1



Figur 2



This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images problems checked, please do not report the problems to the IFW Image Problem Mailbox**